

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
 INSTITUT NATIONAL
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
 PARIS

(11) N° de publication :
 (à n'utiliser que pour les
 commandes de reproduction)

2 742 661

(21) N° d'enregistrement national :

95 15225

(51) Int Cl⁶ : A 61 K 35/02, A 61 K 7/48

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 21.12.95.

(71) Demandeur(s) : TEXINFINE SOCIETE ANONYME —
 FR.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
 demande : 27.06.97 Bulletin 97/26.

(72) Inventeur(s) : GUTIERREZ GILLES, LOPEZ
 EVELYNE, MILET CHRISTIAN et SERRAR
 MOSTAPHA.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
 recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
 présent fascicule.

(73) Titulaire(s) :

(60) Références à d'autres documents nationaux
 apparentés :

(74) Mandataire : GEFIB.

(54) NOUVELLE UTILISATION DE COMPOSITIONS CONTENANT DE LA NACRE.

(57) L'invention concerne une nouvelle utilisation de la nacre en vue de la réalisation d'une préparation pharmaceutique et/ou cosmétique destinée à assurer la synthèse de nouvelles cytokératines.

La nacre est utilisée sous forme de poudre fine mélangée avec des excipients convenables pour réaliser des milieux de cultures cellulaires sécrétant des cytokératines.

Les cellules sécrétant des cytokératines sont choisies parmi les fibroblastes, les lymphocytes, les kératinocytes et les cellules endothéliales.

Les compositions selon l'invention favorisent la synthèse de substances néoformées comme les cytokératines par les kératinocytes.

Les compositions cosmétiques et pharmaceutiques selon la présente invention permettent l'amélioration de l'aspect de la peau.

FR 2 742 661 - A1



NOUVELLE UTILISATION DE COMPOSITIONS CONTENANT DE LA NACRE

5 L'invention concerne une nouvelle utilisation de la nacre à des fins médicales et/ou cosmétologiques.

10 La nacre est connue depuis longtemps pour ses propriétés régénératrice des os. La Demanderesse a étudié les conséquences de l'emploi de la nacre sur d'autres types de cellules comme les fibroblastes, les lymphocytes, les kératinocytes et les cellules endothéliales. L'observation des comportements cellulaires a permis de constater de nouvelles propriétés non décrites à ce jour et qui permettent d'employer la nacre pour ces nouvelles utilisations. En effet, la poudre de nacre ajoutée à la culture de kératinocytes provoque de manière inattendue une synthèse accrue de cytokératines.

15 A ce jour beaucoup de produits sur le marché ont pour objectif d'éliminer la kératine et par là de faire apparaître les couches cellulaires sous-jacentes en donnant ainsi à la peau un aspect rajeuni mais avec l'inconvénient de léser le capital cellulaire et d'affaiblir le rôle protecteur de l'épiderme.

20 L'invention consiste donc dans l'utilisation de la nacre préparée de manière fine et en son mélange avec des excipients convenables pour l'appliquer soit dans des milieux de cultures cellulaires soit dans des préparations cosmétiques ou pharmaceutiques pour effectuer une synthèse très importante de nouvelles cytokératines ce qui confère à la peau une meilleure résistance au soleil et aux agressions, comme l'exposition prolongée à l'eau, au froid etc...

25 La nécessité de donner à la peau un aspect stimulé ou rajeuni utilise jusqu'à ce jour des soins qui éliminent la couche cornée superficielle avec la triple conséquence :

- 30 a) - d'affiner la peau par un amincissement de l'épiderme alors que celui-ci voit son épaisseur diminuer avec l'âge,
- b) - de diminuer le nombre de cellules de l'épiderme entamant ainsi le capital de réplication cellulaire,
- 35 c) - d'enlever les cellules apoptosées ou mortes, de la partie superficielle de l'épiderme, éliminant ainsi le film protecteur du stratum corneum et plus particulièrement du stratum disjonctum, sensibilisant la peau aux agressions extérieures.

40 D'autres techniques de soins font appel à des aspects strictement visuels comme le dépôt d'un film lipophile ou siliconé, brillant ou satiné, qui rend étanche les couches externes et évite ainsi leur déshydratation. Enfin, les modifications de la couleur de la peau assurent un aspect plus chaleureux (bronzage) ou juvénile (blanchiment) en s'associant souvent à des protecteurs solaires (écrans organiques ou minéraux) ou des stimulants du bronzage naturel ou artificiel (D.H.A.). Ces soins ne contribuent en aucune façon à améliorer la qualité naturelle de la peau puisqu'ils ne sont, en fait que des maquillages.

45 C'est pourquoi la présente invention vise à résoudre le problème technique qui n'avait pas été résolu jusqu'ici de présenter à la surface de la peau une structure néoformée qui lui confère un aspect jeune et dynamique sans éliminer les cellules. La structure présentée à la surface cutanée

doit être une substance naturellement produite par les cellules épithéliales comme les kératinocytes et qui contribue à l'épaississement physiologique de l'épiderme.

5 La solution retenue a été de choisir de ne pas décaper la peau pour amener à la surface de nouvelles structures cellulaires mais de faire produire aux kératinocytes des substances néoformées, les cytokératines, que génèrent normalement ces cellules lorsqu'elles sont jeunes ou actives.

10 Ces substances protéiques contribuent ainsi à l'épaississement de l'épiderme par l'amélioration de la qualité cytoplasmique des kératinocytes ainsi que des cornéocytes, et par voie de conséquence à sa résistance passive aux agressions extérieures. De plus, la restructuration des stratum épithéliaux améliore la masse de l'épiderme constituant une réserve de messagers et ainsi contribuant à sa résistance active aux agressions extérieures.

15 La Demandérresse a constaté que la nacre contenait dans son biocristal des substances susceptibles d'activer les cellules de l'animal pour réparer la coquille lorsque celle-ci était lésée. Certaines substances contenues dans le biominéral qu'est la nacre, sont de nature protéique et répondent bien aux anticorps dirigés contre les collagènes humains et de rats, de type I et III. Il existe donc bien une analogie entre la peau et la coquille des conchifères.

20 Grâce à cette observation la Demandérresse a envisagé et vérifié que la nacre contenait des substances originales qui pouvaient intervenir dans les processus de restructuration de la peau. La partie la plus superficielle de la peau est constituée par des cellules anucléées dont les couches les plus externes forment le Stratum corneum. Cette couche cornée externe peut être à l'image de la coquille des bivalves. Il y a donc tout lieu de penser que les processus de restauration de cette structure, (constituée de matière sans matériel nucléaire et génétique comme l'est la coquille), pouvait répondre aux mêmes signaux de restauration. Il restait cependant un problème difficile à résoudre du fait que la coquille des bivalves baigne dans l'eau et que les substances relarguées à partir de la coquille à l'occasion d'une lésion doivent répondre à une spécificité d'action très précise.

30 De ce fait la Demandérresse s'est heurtée à de nombreuses difficultés pour faire exprimer cette activité et la mettre en évidence.

35 L'analyse des protéines après un broyage traditionnel de la nacre montre que celle-ci peut contenir 1,6 mg de substances protéiques par gramme. On a constaté que ces substances ne développaient pas la même activité (phosphatase alcaline) sur une culture d'ostéoblastes selon la dilution. De plus on a noté de manière inattendue que si l'on diluait la nacre en poudre par une autre poudre constituée essentiellement par de l'aragonite (constituant minéral de la nacre), la réponse des cellules à la présence de biocristaux de nacre se trouvait amplifiée. C'est donc avec une préparation constituée de 90 % d'aragonite et de 10 % de nacre que les essais décrits ci-dessous ont été réalisés. Selon l'effet souhaité il est possible d'utiliser des dilutions allant de 0,1 % à 98 % de nacre dans le mélange total.

45 Si la nacre permet de développer un effet dermo-protecteur c'est dans la synthèse des constituants du Stratum corneum que l'on trouve le plus de modifications. La couche cornée étant constituée par la condensation des cytokératines, la Demandérresse a orienté ses analyses vers cette matière. Les conséquences envisageables seront essentiellement dans la qualité de la réponse des cellules au stress d'une agression (synthèse d'interleukine 1 : IL-1). De plus la peau est soumise à une importante activité photolumineuse à laquelle elle répond par la synthèse d'un élément photoprotecteur : la mélanine. Logiquement on doit observer une diminution de la synthèse de la mélanine ou une meilleure répartition de celle-ci dans les kératinocytes.

Rôle de la nacre dans la synthèse des cytokératines.

Les cytokératines se distinguent par leur poids moléculaires et pour la plupart d'entre elles il existe un anticorps spécifique. Afin d'étudier l'ensemble du phénomène, on a utilisé un anticorps dirigé contre l'ensemble des cytokératines. De ce fait il est appelé anti-pan cytokératines.

On a donc réalisé la culture cellulaire de kératinocytes obtenus à partir de prélèvement chirurgicaux de peau. La peau est traité par digestion enzymatique et mise en incubation dans un milieu spécifique (Mac Koy modifié ou du type KBM- Kératinocytes Basal Medium -): milieu de culture ne contenant pas de sérum.

10⁵ cellules sont incubées pendant 24 heures en présence de 50 mg de nacre par ml de milieu dépourvu de sérum de veau foetal ou de sérum protéique similaire.

Les cellules sont rincées, le surnageant éliminé, les cellules sont séparées de la nacre, lysées, puis un « western blot » est réalisé sur la fraction cellulaire. La technique du « western blot » est une technique analytique basée sur une séparation des protéines selon leur poids moléculaire par électrophorèse suivie d'une détection immunologique. Un anticorps de deuxième couche greffé à un enzyme révèle le premier anticorps lors de la mise en contact avec un substrat chromogène. Pour obtenir des résultats interprétables plusieurs dilutions sont testées et la quantification de la substance à doser, -ici les pancytokératines- se fait par simple spectrophotométrie d'absorption ou par analyse d'image de la plaque de révélation. Dans ces conditions on a constaté que l'hypothèse de base se vérifiait et que la nacre était susceptible de doubler la quantité de cytokératines synthétisée par les kératinocytes. Les résultats sont étudiés en tenant compte de la synthèse protéique totale sur plusieurs dilutions car d'une part le nombre de cellules n'est pas rigoureusement constant et d'autre part leur activité n'est pas nécessairement coordonnée.

Protéines totales (en µg)

volume testé en µl :	10	20	40
témoin (sans nacre)	8	9,3	18,3
nacre	3	7,5	12

Signal cytokératine

volume testé en µl :	10	20	40
témoin (sans nacre)	62,8	70,9	178
nacre	18,4	108	275

Signal cytokératine (X 10) / Protéines totales

volume testé en µl :	10	20	40
témoin (sans nacre)	78	76	97
nacre	61	130	230

Rapport Nacre / témoin

volume testé en µl :	10	20	40
rapport	0,78	1,89	2,36

On note donc que la nacre augmente la synthèse des pan-cytokératines d'un facteur multiplicatif de l'ordre de 2.

5

La figure 1 est une représentation graphique de l'évolution de la synthèse des pan-cytokératines en fonction du volume testé.

On y a montré le rapport signal cytokératine X 10 / μ g de protéines totales pour le témoin et pour les préparations à base de nacre.

10

On notera que l'analyse prend toute sa sensibilité lors de l'électrophorèse d'au moins 20 μ l.

Si la synthèse de cytokératines améliore les propriétés mécanique de la peau, il est possible d'envisager un rôle protecteur de la nacre lors des agressions. On peut considérer deux types de réponses aux agressions : les réponses aux agressions de type chimique ou biologique mettant en jeu l'interleukine en première intention et les réponses impliquant la mélanine.

20

Rôle de la nacre sur la synthèse de l'interleukine 1 (II-1):

La figure 2 représente les résultats obtenus lors de la culture de la lignée cellulaire HL 60 en présence de nacre.

On note une diminution importante de la sécrétion d'II-1 lorsque les cellules sont en présence de nacre.

30

Réaction de protection mettant en jeu la mélanine.

La culture de mélanocytes (lignée de l'ECACC) lignée G 361 en présence de nacre ne modifie que faiblement la sécrétion de la mélanine.

35

Moyenne

témoin	0,150	0,149	0,148	0,149
nacre 0,5 %	0,150	0,132	0,140	0,141
nacre 1%	0,139	0,137	0,143	0,141

40

On constate néanmoins que le nombre de « dendrites » des mélanocytes est augmenté lors de la coculture mélanocytes - kératinocytes issus d'explants de la peau.

45

(nombre de dendrites)

témoin	5
nacre 0,2 %	12
nacre 1%	15

50 On en déduit une meilleure répartition de la mélanine.

REVENDICATIONS

1. **Nouvelle utilisation de la nacre en vue de la réalisation d'un médicament destiné à améliorer la synthèse de nouvelles cytokératines.**
- 5
2. **Nouvelle utilisation de la nacre en vue de la réalisation d'une préparation cosmétologique destinée à améliorer la synthèse de nouvelles cytokératines.**
- 10
3. **Utilisation de la nacre sous forme finement pulvérulente et mélangée avec des excipients convenables en vue de son application dans des milieux de cultures cellulaires.**
- 15
4. **Utilisation de la nacre selon les revendications 1 et 2, en vue de la préparation d'une composition qui favorise la synthèse de substances néoformées comme les cytokératines, par les kératinocytes.**
- 20
5. **Utilisation de la nacre selon les revendications 1 à 4, dans laquelle la nacre est additionnée d'aragonite dans une proportion allant de 0,1% à 98% de nacre dans le mélange.**
- 25
6. **Utilisation de la nacre selon la revendication 1, sous forme finement pulvérulente et mélangée à des excipients convenables, en vue de la réalisation de compositions pharmaceutiques assurant l'amélioration des qualités de la peau.**
- 30
7. **Utilisation de la nacre selon la revendication 2, sous forme finement pulvérulente et mélangée à des excipients convenables, en vue de la réalisation de compositions cosmétiques assurant l'amélioration de l'aspect de la peau.**
8. **Utilisation de la nacre selon les revendications 2 et 7 en vue de la préparation d'une composition assurant l'amélioration des propriétés mécaniques de la peau.**

9. Utilisation de la nacre selon les revendications 1 et 6 en vue de la préparation d'une composition assurant les processus de restauration de la structure de la peau.

5

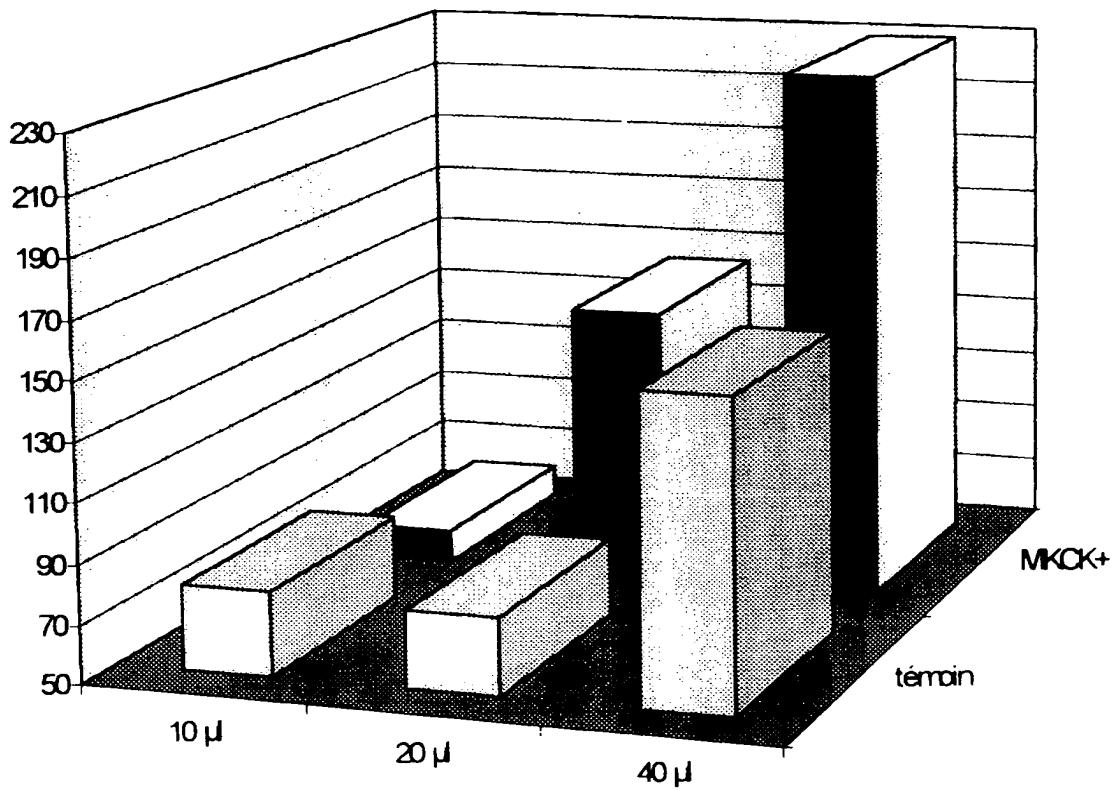
10. Utilisation de la nacre selon les revendications 1 et 6 en vue de la réalisation d'une composition exerçant un rôle protecteur sur la peau et lui conférant une résistance active dans des conditions extérieures agressives.

10 11. Utilisation de la nacre selon l'une au moins des revendications 1, 2, 6 et 7, en vue de la réalisation d'une préparation qui confère un aspect jeune et dynamique à la peau, grâce à une structure néoformée à la surface.

15

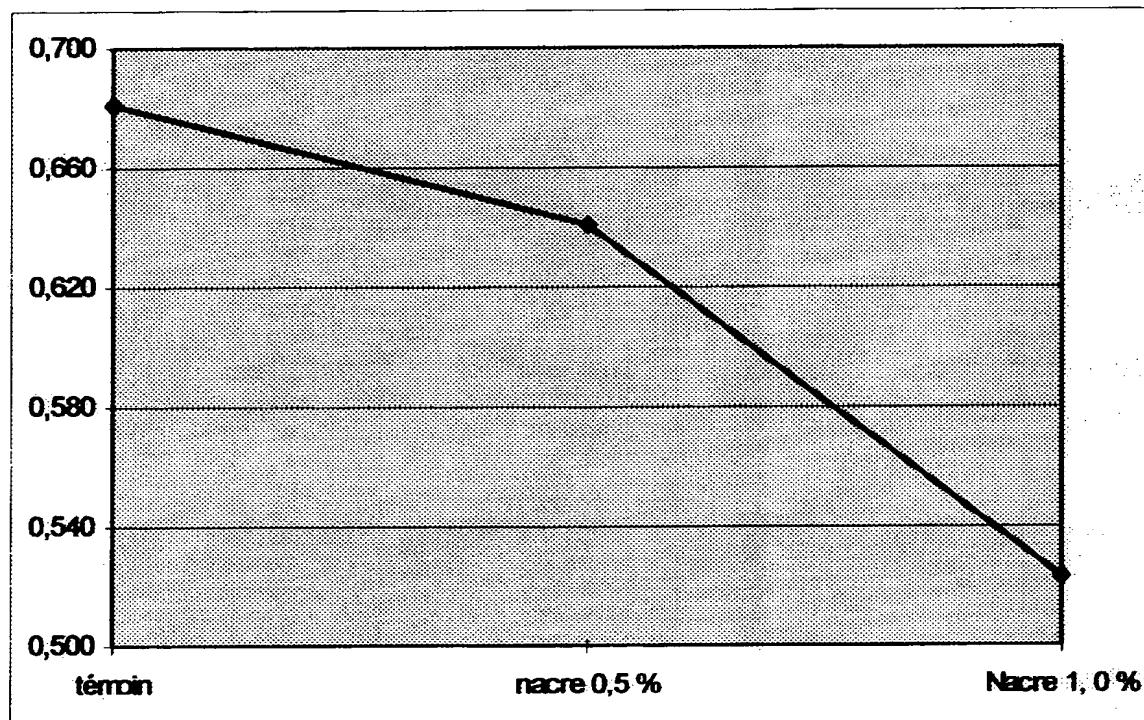
RECEIVED
UNIVERSITY LIBRARIES
2001

1/2

Figure 1

BEST AVAILABLE COPY

2/2

Figure 2**Densité optique**

BEST AVAILABLE COPY

BLANK PAGE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche2742661
N° d'enregistrement
nationalFA 529632
FR 9515225

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée	
Catégorie	Chiffre du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 124, no. 11, 11 Mars 1996 Columbus, Ohio, US; abstract no. 144336r, page 1084; colonne R; XP002017602 * abrégé * & CN-A-1 107 335 (YIREN BIOCHEMICAL TECH. DEV. CO., LTD.) 30 Août 1995 ---	1-11	
A	US-A-4 393 045 (E.G. HENDERSON ET AL.) 12 Juillet 1983 * revendications *	1-11	
A	EP-A-0 393 267 (M. KATO ET AL.) 24 Octobre 1990 * revendications; exemple 17 *	1-11	
A	WO-A-95 30426 (S. CAMPRASSE ET AL.) 16 Novembre 1995 * revendications *	1-11	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)
A	DE-A-34 37 184 (E. IWAN ET AL.) 17 Avril 1986 * le document en entier *	1-11	A61K C12N C07K
A	FR-A-2 715 568 (J. VIRASSAMY) 4 Août 1995 * revendications *	1-11	-----
1		Date d'entame de la recherche	Examinateur
EPO FORM 1501 (1982) (PC11)		5 Novembre 1996	Ryckebosch, A
CATEGORY DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date ou dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou antérieure technologique général O : divulgué une écriture P : document interne			

BLANK PAGE